

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-252979

(43)Date of publication of application : 05.10.1993

(51)Int.Cl.

C12P 21/06
// A23J 3/16
A23J 3/34

(21)Application number : 04-043339

(71)Applicant : NIPPON STEEL CORP
NIPPON STEEL CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 28.02.1992

(72)Inventor : KONO SHINKICHI
KANO KANEO

(54) PRODUCTION OF LOW-MOLECULAR PEPTIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a low-molecular peptide mixture consisting essentially of a dipeptide and a tripeptide in high yield with hardly any formation of a free amino acid by using a soybean protein as a raw material.

CONSTITUTION: The objective method for producing a low-molecular peptide is characterized by simultaneously or successively reacting a soybean protein as a raw material with two or more enzymes having only the endoprotease activity. Free amino acids are hardly produced. Thereby, the low-molecular peptide mixture, having ≤ 3 average chain length and consisting essentially of a dipeptide and a tripeptide can be obtained in high yield.

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-252979

(43)公開日 平成5年(1993)10月5日

(51)IntCl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/06		8214-4B		
// A 2 3 J 3/16		7236-4B		
3/34		7236-4B		

審査請求 未請求 請求項の数1(全 4 頁)

(21)出願番号 特願平4-43339

(22)出願日 平成4年(1992)2月28日

(71)出願人 000006655

新日本製鐵株式会社
東京都千代田区大手町2丁目6番3号

(71)出願人 000006644

新日鐵化学株式会社
東京都中央区銀座5丁目13番16号

(72)発明者 河野 慎吉

神奈川県川崎市中原区井田1618 新日本製
鐵株式会社先端技術研究所内

(72)発明者 加納 周雄

神奈川県川崎市中原区井田1618 新日本製
鐵株式会社先端技術研究所内

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54)【発明の名称】 低分子ペプチドの製造方法

(57)【要約】

【目的】 原料として大豆タンパク質を用いて、遊離アミノ酸の生成が少なく、ジペプチド及びトリペプチドを主成分とする低分子ペプチド混合物を高収率に得る製造方法を提供する。

【構成】 大豆タンパク質を原料として、エンドプロテアーゼ活性のみを持つ酵素の二種以上を同時又は逐次的に作用させることを特徴とする低分子ペプチド製造方法。

【効果】 本発明の方法により、遊離アミノ酸の生成が少ない、ジペプチド及びトリペプチドを主成分とする平均鎖長3以下の低分子ペプチド混合物を高収率に得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 大豆タンパク質を原料として、エキソプロテアーゼ活性を実質的に持たずエンドプロテアーゼ活性のみを持つ酵素の二種以上を同時又は逐次的に作用させることにより、生成する遊離アミノ酸が5%以下であり、ジペプチド及びトリペプチドを主成分とする平均鎖長3以下の低分子ペプチド混合物を生成することを特徴とする低分子ペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、大豆タンパク質に対して酵素を作用させることにより、ジペプチド及びトリペプチドを高収率に得る低分子ペプチドの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年栄養学の進歩により、アミノ酸とペプチドの腸管からの吸収に関して、ジペプチド及びトリペプチドはアミノ酸よりも吸収速度が速いこと、これらのペプチドにはアミノ酸に見られる吸収時の相互の拮抗がないこと、テトラ以上のペプチドにはジペプチド及びトリペプチドのような作用が見られないことが明らかになってきた。このような背景からジペプチド及びトリペプチドは、用途及び製造方法に関して注目されている。

【0003】これまでに知られている低分子ペプチドの製造方法には、特公昭57-45560号公報に示されるような酸性プロテアーゼを用いるものがあるが、酸性プロテアーゼにはエキソプロテアーゼ活性を併せ持つものが多く、反応に際して遊離アミノ酸の生成を避けることはできない。また特公平3-58719号公報に示されるアルカリプロテアーゼをpH5~7で作用させる方法でも、大豆タンパク質を原料とした場合には平均鎖長4.5以下にはなっていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、原料として大豆タンパク質を用いて、遊離のアミノ酸の生成が少なく、ジペプチド及びトリペプチドを主成分とする低分子ペプチド混合物を高収率に得る製造方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】大豆タンパク質を原料として、遊離のアミノ酸を生成せず低分子ペプチドを製造するためには、エキソプロテアーゼ（エキソペプチダーゼ）活性を持たずエンドプロテアーゼ活性のみを持つ酵素を使用すればよい。このような酵素は中性領域に至適pHを持つBacillus属由来のものが多い。しかしながら、これらの酵素を単独で使用した場合には、ある程度まで分解したところで酵素反応が終了し、若干のジペプチド及びトリペプチドを生成するが、鎖長4以上のオリゴペプチドが大量に残る。従って、目的とする平均鎖長3以下のジペプチド及びトリペプチドを主成分とする低分子

ペプチド混合物を製造することはできない。先に説明した特公平3-58719号公報に示されるように、酵素の至適pHと異なるpHで反応させる技術をもってしてもこの事は達成されていない。

【0006】そこで、本発明者らは、酵素の種類、反応条件等につき鋭意検討を行ったところ、二種以上の酵素を同時又は逐次的に用いることにより、反応が効率的に行われ、製造物がテトラペプチド以上のオリゴペプチドにとどまらずジペプチド及びトリペプチドにまで分解された平均鎖長3以下の低分子ペプチド混合物となることを見いだし本発明を完成するに至った。

【0007】即ち、本発明の低分子ペプチドの製造方法は、大豆タンパク質を原料として、エキソプロテアーゼ活性を実質的に持たずエンドプロテアーゼ活性のみを持つ酵素の二種以上を同時又は逐次的に作用させることにより、生成する遊離アミノ酸が5%以下であり、ジペプチド及びトリペプチドを主成分とする平均鎖長3以下の低分子ペプチド混合物を生成することを特徴とするものである。

【0008】本発明において使用する酵素は、エキソプロテアーゼ活性を実質的に持たずエンドプロテアーゼ活性のみを持つものであればよい。ここで、エキソプロテアーゼ活性を実質的に持たずとは、その酵素単独で大豆タンパク質に作用させたとき生成する遊離アミノ酸が5%以下であることをいう。このような酵素は中性領域に至適pHを持つBacillus属由来のものが多い。具体的にはプロテアーゼN（天野製薬）、プロテアーゼS（天野製薬）、ヒオタミラーゼ（長瀬産業）、サモアーゼ（大和化成）等が好適に用いられる。

【0009】本発明において使用する原料の大豆タンパク質は、丸大豆、脱皮大豆、脱脂大豆、分離大豆タンパク等いずれも用いることができるが、酵素反応の効率から、粉末状に粉碎したものが好ましい。反応基質濃度は使用する酵素の種類及び添加量により異なるが、通常1~30%であり、反応は水性媒体中で行う。

【0010】反応温度は使用する酵素の至適温度が好ましい。通常使用する酵素では、反応温度は通常30~70℃、好ましくは40~60℃である。反応時間は使用する酵素の種類及び添加量により異なるが、通常6~48時間、好ましくは16~48時間である。酵素の失活は必要に応じて行うことができる。本発明の方法では遊離アミノ酸を5%を超えて生成しない条件をとっており、長時間反応を続けても一度生成したジペプチド及びトリペプチドがそれ以上分解されることはないので、失活を行わなくても目的は達成される。また、以降の用途などで失活をした方が好ましい場合には、公知の加熱失活などを行うことができる。

【0011】反応pHについては、中性領域に至適pHを持つBacillus属由来の酵素を用いる場合、通常大豆タンパク質溶液のpHは中性領域にあるため、pH調節の必要は

ない。本発明によれば、中性領域に至適pHを持つ酵素を使用することにより、反応に際して特にpHを調整する必要はないので、pH調整に用いる酸又はアルカリの混入がなく、新たな塩の生成がない。低分子ペプチドと塩の分離には困難が伴うため、本発明の方法は低分子ペプチドを以後の用途に供する場合、非常に有利な方法である。

【0012】本発明の方法で反応を行うと、ジペプチド及びトリペプチドを主成分とする平均鎖長3以下の低分子ペプチドは、反応液中に可溶化状態で存在している。この低分子ペプチドを水生媒体中から取り出すに際して、不溶物が存在する場合には、遠心分離あるいは濾過などの方法で容易に除去できる。また水性媒体中に不溶物が存在しない場合にはそのまま取り出すことができる。更に乾燥物とする場合には、凍結乾燥あるいはスプレードライなどの方法をとることができる。

【0013】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、以下の実施例において本発明の方法で得られた生成物の分析方法は次の通りである。

【0014】1. 収率

窒素量を全窒素分析装置（住友化学社製）で測定し、生成物の収率を以下の式で求めた。

$$\text{収率} = \frac{\text{生成物中の窒素量}}{\text{原料中の窒素量}} \times 100 (\%)$$

2. 遊離アミノ酸生成量

生成物を銅塩法でペプチドと遊離アミノ酸とに分離し、遊離アミノ酸をアミノ酸分析計（日立L-8500）で定量した。酸性アミノ酸については別途直接アミノ酸分析計で定量した。

【0015】3. 平均ペプチド鎖長

*

* 平均ペプチド鎖長は以下の式で求めた。

$$\text{平均鎖長} = \frac{A-B}{C-B}$$

A：生成物の6N塩酸加水分解物中のアミノ基

B：遊離アミノ酸相当のアミノ基

C：生成物中のアミノ基

6N塩酸加水分解物のアミノ酸はアミノ酸分析計にて定量した。アミノ基の定量はトリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）法によった。遊離アミノ酸相当のアミノ基は2.の結果から算出した。

【0016】

【実施例1】大豆タンパク質（日清製油社製：ソルビーM）5gを水に分散し全容を100mlとした後、50℃に加熱し、酵素としてプロテアーゼNアマノ（天野製薬社製）0.1g、プロテアーゼSアマノ（天野製薬社製）0.1g、ピオタミラーゼP-1000（長瀬産業社製）0.1gを同時に添加し、反応温度50℃にて低速で攪拌しながら24時間反応させた。反応後、それぞれの反応液を25,000gで10分間遠心分離し不溶物を除去した上清画分を凍結乾燥した。得られた試料の平均鎖長、遊離アミノ酸含有量、収率を表1に示す。

【0017】なお、比較のために、酵素としてプロテアーゼNアマノ（天野製薬社製）0.1g、プロテアーゼSアマノ（天野製薬社製）0.1g、ピオタミラーゼP-1000（長瀬産業社製）0.1gをそれぞれ単独で添加した結果も表1に示す。

【0018】

【表1】

使用酵素	平均鎖長	遊離アミノ酸	収率
3種酵素 (Nアマノ, Sアマノ, P-1000)	3.0	3.5 %	90 %
Nアマノ	4.0	2.0 %	88 %
Sアマノ	4.5	2.2 %	87 %
P-1000	4.7	2.1 %	87 %

【0019】

【実施例2】大豆タンパク質（日清製油社製：ソルビーM）5gを水に分散し全容を100mlとした後、50℃に加熱し、プロテアーゼNアマノ（天野製薬社製）0.2g、ピオタミラーゼP-1000（長瀬産業社製）0.2gを同時に添

50

加し、反応温度50℃にて低速で攪拌しながら24時間反応させた。反応後、反応液を25,000gで10分間遠心分離し不溶物を除去した上清画分を凍結乾燥した。得られた試料の平均鎖長は2.9、遊離アミノ酸含有量3.8%、収率89%であった。

【0020】

【実施例3】大豆タンパク質（日清製油社製：ソルビー M）5g を水に分散し全容を 100ml とした後、50°C に加温し、プロテアーゼ N アマノ（天野製薬社製）0.2g を添加し、反応温度 50°C にて低速で攪拌しながら 24 時間反応させた後、プロテアーゼ S アマノ（天野製薬社製）0.2g、ピオタミラーゼ P-1000（長瀬産業社製）0.2g を添加し、更に反応温度 50°C にて低速で攪拌しながら 20 時間反応させた。反応後、反応液を 25,000g で 10 分間遠心分離し不溶物を除去した上清画分を凍結乾燥した。得られた試料の平均鎖長は 2.7、遊離アミノ酸含有量 4.2%、収率 95% であった。

【0021】

【実施例4】大豆タンパク質（日清製油社製：ソルビー

M）5g を水に分散し全容を 100ml とした後、50°C に加温し、ピオタミラーゼ P-1000（長瀬産業社製）0.2g を添加し、反応温度 50°C にて低速で攪拌しながら 2 時間反応させた後、プロテアーゼ N アマノ（天野製薬社製）0.1g を添加し、更に反応温度 50°C にて低速で攪拌しながら 24 時間反応させた。反応後、反応液を 25,000g で 10 分間遠心分離し不溶物を除去した上清画分を凍結乾燥した。得られた標品の平均鎖長は 2.8、遊離アミノ酸含有量 4.0%、収率 92% であった。

【0022】

【発明の効果】本発明の方法により、遊離アミノ酸の生成の少ない、ジペプチド及びトリペプチドを主成分とする平均鎖長 3 以下の低分子ペプチド混合物を高収率に得ることができる。